

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTA DE MEDICINA

E. A. P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“Evaluación de tres primeros para la detección
molecular de *Giardia intestinalis* en muestras
fecales humanas”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado Tecnología Médica en área de Laboratorio
Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Giancarlo Eduardo Rojas Hinostroza

ASESOR

Yrma Espinoza Blanco

Lima – Perú

2014

ASESOR

Blgo. Yrma Espinoza Blanco.

CO-ASESORES

Lic. T.M. William Roldán Gonzales.

Mg. Segundo León Sandoval.

Lugar de ejecución del presente estudio
Laboratorios de las Secciones Científicas de
Parasitología; y de Epidemiología Molecular
y Genética, del Instituto de Medicina Tropical
“Daniel A. Carrión” de la Facultad de Medicina
de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Dedicada:

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por siempre estar conmigo en cada paso que doy y por guiarme en todo momento.

A mi Papá Erver Rojas por su esfuerzo y apoyo y a mi mamá Lucia Hinostroza por sus consejos, paciencia, esmero, palabras de aliento y ayuda en todo momento.

A mis hermanos Jessyca y Jason por siempre estar a mi lado en mi largo caminar y su interés por mí.

A mi abuelita Celia por las oraciones que siempre me brindaba para que todo resulte excelente.

A Raiza, por sus palabras de aliento, consejos, por estar siempre a mi lado.

Agradezco:

A la Blgo. Yrma Espinoza Blanco por el apoyo constante brindado en todo momento y paciencia en toda la realización de la tesis.

Al Lic. T.M William Roldan Gonzales por sus recomendaciones y ayuda para poder efectuar con éxito la tesis.

Al Mg. Segundo León Sandoval por los consejos, amabilidad y deferencia en la revisión de la tesis.

A la Tec. Susana Jiménez por sus consejos, apoyo y palabras de aliento durante el desarrollo de la tesis.

A mis amigas Mirian Cárdenas y Nataly Carbajal por su apoyo, colaboración y ayuda en el desarrollo de la tesis.

A mis padres, hermanos y abuelitos por siempre estar a mi lado, por brindarme su apoyo.

ABREVIATURAS:

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

HSP70: Proteína de choque térmico 70

ADN: Acido desoxirribonucleico

Cl₂Mg: Cloruro de Magnesio

dNTPmix: Desoxinucleótidos trifosfato con adenina, guanina, citosina y timina

OMS: Organización Mundial de la Salud

NCBI: Centro Nacional de Información sobre Biotecnología

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

RFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmento de restricción

mL: Mililitros

L: Litro

°C: Grado centígrado

μM: Micromolar

mM: Milimolar

V: Voltios

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. METODOLOGÍA.....	8
3.1. Tipo de Estudio	8
3.2. Diseño de Estudio.....	8
3.3. Diseño Muestral	8
3.3.1. Población	8
3.3.2. Marco muestral.....	8
3.3.3. Tipo de muestra	9
3.3.4. Tamaño de la Muestra	9
3.3.5. Procedimiento de muestreo.....	9
3.3.6. Procedimiento de recolección de datos	9
3.3.7. Procedimiento para garantizar los aspectos éticos en el estudio de investigación:.....	10
3.4. Plan de Procedimiento.....	10
3.4.1. Aislados clínicos de parásitos	10
3.4.2. Recolección de las muestras fecales:	10
3.4.3. Examen parasitológico de las muestras fecales.....	10
3.4.4. Extracción del ADN genómico de las muestras fecales.....	11
3.4.5. Primers para la prueba de PCR.....	11
3.4.6. PCR convencional.....	12
3.4.7. Electroforesis de los productos de amplificación de la prueba de PCR	12
3.4.8. Análisis de las reacciones cruzadas de las pruebas de PCR convencional.....	13
3.5. Análisis de los resultados.....	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN.....	22
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
6.1 CONCLUSIONES	26
6.2 RECOMENDACIONES	26

VII. BIBLIOGRAFIA	27
VIII. ANEXO	32
Anexo 1.	32
PROTOCOLO DE RECOLECCION DE MUESTRA DE HECES.....	32
Anexo 2:	33
PROTOCOLO DEL EXAMEN PARASITOLOGICO	33
Anexo 3.	35
EXTRACCIÓN DE ADN.....	35
Anexo 4.	37
PROTOCOLO DE PCR	37
Anexo 5.	38
PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS.....	38

I. RESUMEN

Introducción: *Giardia intestinalis* es el protozooario intestinal más común a nivel mundial y su diagnóstico parasitológico está basado en el examen microscópico, sin embargo, debido al carácter intermitente de la excreción del parásito en las heces el método puede revelar baja sensibilidad, esto ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas de diagnóstico entre las que destacan aquellas que tiene como base la biología molecular. **Objetivos:** Evaluar 3 primers para la detección molecular de *G. intestinalis* en muestras fecales. **Diseño:** Se realizó un estudio observacional, de corte transversal. **Lugar:** Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM. **Procedimiento:** Se evaluaron primers que amplifican las regiones de la beta-giardina y de la proteína de choque térmico 70 del ADN de *G. intestinalis*. **Principales medidas de resultados:** Se recolectó muestras fecales positivas y negativas a *G. intestinales* y a otros parásitos, las cuales fueron concentradas por centrifugación, luego almacenadas a -20°C y posteriormente analizadas mediante la técnica de PCR convencional. **Resultados:** Se estableció una temperatura de hibridación de 60°C para los primers de la beta-giardina y la proteína de choque térmico 70. La mezcla de reacción se estandarizó con las siguientes condiciones: Cl₂Mg 1.5 mM, primers 0.6 µM, dNTPmix 0.3 mM y taq polimerasa 0.75 U. El límite de detección de los primers fue de 87.3 ng/µL para beta-giardina, 359.5 ng/µL para GHSP70-1 y 24.1 ng/µL para GHSP70-2. **Conclusiones:** Se estableció una temperatura de hibridación y concentración de cloruro de magnesio común para los primers. Se observó un mejor límite de detección para el primer GHSP70-1 identificándose bandas en 7 diluciones con una sensibilidad y especificidad mayor que para el primer de la beta-giardina.

Palabras claves: *Giardia intestinalis*, PCR convencional, beta giardina, proteína de choque térmico 70.

I. ABSTRACT

Introducción: *Giardia intestinalis* is the most common intestinal protozoan worldwide and its parasitologic diagnosis is based in microscopic examination; nonetheless, due to the intermittent parasites excretion in the feces, this method could reveal low sensitivity, this has motivated the search of new diagnostic alternatives such as those based on molecular biology. **Goals:** To assess 3 primers for the molecular detection of *G. intestinalis* in stool samples. **Design:** an observational, cross-sectional study was implemented. **Settings:** Tropical Medicine Institute “Daniel A. Carrión”, UNMSM. **Procedures:** We assessed primer that amplifies beta-giardin and heat-shock protein 70 of the *G. intestinalis*. **Main measures of:** Positives and negatives stool samples for *G. intestinalis* and for other parasites were collected and then concentrated by centrifugation and stored at -20°C for further analysis using conventional PCR. **Results:** A 60°C hybridization temperature was established for the primers of beta-giardin and the heat-shock protein 70. The master mix was standardized with the following conditions: 1.5mM Cl₂Mg, 0.6 uM primers, 0.3mM dNTPmix and 0.75U Taq polimerasa. Limit detections were 87.3 ng/μL for beta-giardin, 359.5 ng/μL for GHSP70-1 and 24.1 ng/μL for GHSP70-2. **Conclusions:** We established a common hibridization temperature and a magnesium chloride common for the primers. A better detection limit was established for the primer GHSP70-1, identifying bands in seven dilutions with sensitivity and specificity higher for the beta-giardine primer.

Palabras claves: *Giardia intestinalis*, PCR, beta-giardina, heat-shock protein 70.

II. INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias son una de las principales causas de enfermedad en países subdesarrollados, donde cerca de 2 mil millones de personas están infectadas con algún enteroparásito, esto produce a su vez diferentes patologías en el hospedero (9). Las altas tasas de prevalencia de los parásitos intestinales son atribuidas en gran medida a la mala situación socioeconómica, pobre saneamiento, atención médica inadecuada, falta de sistemas de salud y a un abastecimiento inadecuado de agua (9). Algunos parásitos habitan en el tracto gastrointestinal causando cuadros diarreicos agudos y crónicos (10,11). Las enfermedades diarreicas ocupan el primer lugar entre las enfermedades que se presentan a nivel global y son una de las dos principales causas de muerte de niños menores de cinco años, con un 16 a 17% de todas las muertes en el mundo (OMS, 2004). Entre los parásitos patógenos los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y el coccidio *Cryptosporidium parvum* son considerados como los más importantes en infecciones gastrointestinales (6, 11, 12). *G. intestinalis* es el protozoario, eucariota, flagelar, unicelular, que con más frecuencia afecta a la población mundial (13-15). A nivel mundial se estima una frecuencia de 200 millones de individuos infectados con *G. intestinalis* de los cuales 500 mil sufren enfermedad clínica (16). *G. intestinalis* presenta dos fases o estadios biológicos: (i) el trofozoíto (forma vegetativa) presenta un tamaño de 9 a 21 μm de largo por 5-15 μm de ancho, de forma piriforme semejante a una gota o lágrima y de simetría bilateral; (17,18) y (ii) El quiste (forma infecciosa resistente) tiene un tamaño de 8 a 12 μm y presenta un contorno ovalado, con una membrana quística de doble pared (16-18). La pared del quiste es retráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar y la porción interna es membranosa; ambas se encuentran separadas por el espacio periplásmico. Se ha encontrado que la pared externa del quiste se encuentra formada por

polímeros del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) (5). Los quistes pueden ser eliminados con las heces y pueden permanecer en suelos húmedos o en agua por varios meses (19). Los quistes son la forma infectante del parásito que ingresan por vía oral, pasan por el estómago y luego se desenquistan en el intestino delgado. El proceso de desenquistamiento ocurre gracias a la exposición del quiste a los jugos gástricos y al pH ácido del estómago, seguido de la acción conjunta de las enzimas pancreáticas y las sales biliares que son secretadas a nivel de duodeno. Cada quiste da origen a dos trofozoítos y, estos se localizan en el duodeno y en los segmentos altos del yeyuno (17, 19, 20). La infección se produce en su mayoría de persona a persona a través de la ingesta de quistes, pero puede haber infección por contacto con animales como perros, gatos, castores y rumiantes.

El género *Giardia* se incluye en el Phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophorea, orden Diplomonadida, familia Hexamitidae que incluye un único género: *Giardia*, siendo uno de los organismos eucariotas más primitivos (5, 20). De acuerdo al criterio de especificidad del hospedador planteado por Kulda (1995) describió cuarenta y uno especies de *Giardia* sin embargo, de acuerdo con Erlandsen (1990) quien toma en cuenta la variación morfológica, la posición de los cuerpos mediales, la forma del parásito y la relación del disco suctor con el tamaño del parásito, se tendrían tres especies a saber: *G. agilis* (anfibios), *G. muris* (roedores, aves y reptiles) y *G. intestinalis* (mamíferos como perro, gato, ganado y el hombre) (1, 5, 16, 17, 20). Hasta el momento se han descrito siete genotipos (denominados A-G) incluidos en *G. intestinalis*, de los cuales los genotipos A y B afectan al hombre (21, 22). El genotipo A se asocia con las cepas humanas y animales teniendo a los subtipos AI y AII, y el B está asociado a cepas humanas al igual que los subtipos BIII y BIV (23). El genotipo con mayor potencial de transmisión zoonótica de *Giardia* es el genotipo A.

Los animales domésticos y animales del campo son considerados reservorios de *Giardia*.

En la actualidad se tienen diferentes pruebas para la identificación y detección de *Giardia*, pero la prueba de referencia continúa siendo la observación microscópica, sin embargo el carácter intermitente y, en general, el bajo nivel de excreción de los quistes en la giardiasis, demuestra que el examen de una única muestra de heces tiene una sensibilidad de entre 35-50% pero la realización de técnicas de concentración y el estudio de heces seriadas incrementan la sensibilidad hasta un 70% (7, 5, 24). Otras pruebas para la identificación de *Giardia* son los métodos inmunológicos que detectan diversos antígenos del parásito en las heces, dentro de estos métodos se encuentran la contraelectroforesis, cuya sensibilidad y especificidad son del 90% y 95%, respectivamente, también se utiliza para la detección de antígenos la inmunofluorescencia directa en esta los anticuerpos monoclonales detectan el antígeno GSA 65 (Meridian Diagnostics), en muestras de heces, dicha prueba presenta una sensibilidad del 94% y una especificidad del 98%, aunque los valores de sensibilidad varían según los diferentes estudios y equipos comerciales (16, 24). Además, dentro de las nuevas metodologías con una mayor sensibilidad que la microscopia óptica se tiene la detección de coproantígenos, la inmunocromatografía, la citometría de flujo, el ELISA y las técnicas moleculares (4,25). Sin embargo, los métodos de laboratorio no diagnostican todos los casos, debido a que los métodos de diagnóstico actuales no son lo suficientemente sensibles para detectar infecciones con carga parasitaria baja (16). Debido a la poca excreción de quistes es necesario tener pruebas diagnósticas más sensibles que permitan detectar entre 1 a 10 quistes/g. En la actualidad las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos proporcionan un amplio rango de diagnóstico para la detección de diferentes parásitos

(26). La PCR proporciona métodos alternativos adecuados para la detección específica de patógenos en las heces, estas metodologías permiten detectar concentraciones de ADN al nivel de nanogramos y en combinación con las técnicas como el polimorfismo en la longitud de fragmento de restricción (RFLP) o PCR anidada, que se ha utilizado para la diferenciación de organismos de acuerdo a sus diferentes genotipos, (4, 8, 26) dicha prueba se ha utilizado para estudiar la epidemiología de la *G. intestinalis* y ha permitido poder estudiar los diferentes genotipos, siendo los más importantes para el hombre los genotipos A y B (1, 3, 27). Además, no solo permite poder determinar la infección sino también determinar la fuente de infección en diferentes situaciones generando un mejor diagnóstico (28). La PCR tiene el potencial para reducir las deficiencias, inconvenientes y riesgos de salud relacionado con los procedimientos de diagnóstico microscópico. La PCR se caracteriza por su alta sensibilidad, especificidad, repetitividad, reproducibilidad, detección de múltiples patógenos, análisis rápido de muchas muestras, costo mínimo y capacidad de discriminar entre géneros y especies (2,25). Se ha demostrado que es tan sensible pero más específica que el examen microscópico, además la PCR permite que un solo patógeno pueda ser detectado con suficiente sensibilidad para un buen diagnóstico clínico, (2, 4, 29, 30) sin embargo la sensibilidad analítica de los distintos primers dependerá que tan específicos son para *G. intestinalis*, pudiendo por lo general detectar de 1 a 10 quistes por mezcla de reacción (5). Las pruebas de PCR presentan una alta fiabilidad, detectando el gen blanco que es amplificado, lo que permite no tener falsos positivos pero esto depende de la calidad y la confección de los primers a utilizar (14). La PCR está basado en una prueba enzimática en la cual se va a amplificar una región determinada de un gen, entre las siguientes regiones que se tienen para *G. intestinalis* se consideran: La subunidad pequeña del ARN ribosomal (rRNA), glutamato deshidrogenasa, el alargamiento del

factor 1-alfa y triosa fosfato isomerasa, proteína de choque térmico y la beta-giardina (3, 31). Estudios previos demuestran que la beta-giardina es específica para *G. intestinalis* siendo la más usada junto con la rRNA para el análisis genotípico (4,32), otros estudios también demuestran que la región de la proteína de choque térmico de *G. intestinalis* contiene regiones conservadas (32, 33) pero el gen del rRNA 18S presenta una alta porcentaje de GC, lo que ocasiona problemas en la amplificación, pudiendo carecer de la especificidad deseada (32). Planteamos el presente estudio cuyos objetivos son los siguientes:

- Estandarizar el procedimiento adecuado para el uso de los primers que amplifican una región del gen que codifica a la beta-giardina para la detección molecular de *G. intestinalis*
- Estandarizar el procedimiento adecuado para el uso de los 2 pares de primers que amplifican una región del gen que codifica a la proteína de choque térmico 70 para la detección molecular de *G. intestinalis*.
- Evaluar 3 primers para la detección molecular de *G. intestinalis* en muestras fecales.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Estudio

Descriptivo

3.2. Diseño de Estudio

Estudio observacional de tipo transversal

3.3. Diseño Muestral

3.3.1. Población

Muestras fecales recolectadas de pacientes que acuden al consultorio externo del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM que presenten diagnóstico positivo o negativo a algún parásito.

3.3.2. Marco muestral

3.3.2.1. Criterio de inclusión

- Las muestras fecales que presentaron un parásito patógeno.
- Las muestras fecales que no tengan ningún parásito.
- Muestras fecales frescas sin ningún preservante.

3.3.2.2. Criterio de exclusión

- Muestras que presenten algún tipo de deterioro morfológico.
- Muestras fecales que presente inhibidores moleculares como: formol, fenol y heparina.

- Muestras fecales que no sean frescas.
- Muestras fecales que presenten algún fijador parasitológico.

3.3.3. Tipo de muestra

Para este estudio la muestra fue de tipo no probabilístico intencionado para una población finita de 30 muestras fecales humanas que se recolectaron del consultorio externo del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM.

3.3.4. Tamaño de la Muestra

Se obtuvieron 15 muestras fecales positivas a *G. intestinalis* y 15 muestras positivas a otras parasitosis o que no presentaron ningún parásito.

3.3.5. Procedimiento de muestreo

Las muestras fecales fueron recolectadas de pacientes que acudieron a los consultorios externos del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM, las cuales fueron concentradas por centrifugación y almacenadas a -20 °C para su evaluación posterior.

3.3.6. Procedimiento de recolección de datos

3.3.6.1. Técnicas

Para este estudio se realizaron las siguientes técnicas:

- Método directo
- Método de concentración por centrifugación
- PCR convencional

3.3.7. Procedimiento para garantizar los aspectos éticos en el estudio de investigación:

El presente estudio incluyo muestras de heces, las mismas son consideradas por el comité de ética como muestra de desecho por tanto no fue necesaria la solicitud de autorización para su uso. Para asegurar la integridad ética del trabajo se aseguro lo siguiente:

- a) Los pacientes no participaron directamente. La colección de muestras de heces no conllevo riesgo alguno para los mismos.
- b) No se entrego incentivos, ni remuneración a los pacientes.
- c) En este trabajo no se van a estudiar ni utilizar drogas terapéuticas en los pacientes.

3.4. Plan de Procedimiento

3.4.1. Aislados clínicos de parásitos

Se utilizó muestras fecales humanas positivas solo a *G. intestinalis*, que fueron diagnosticadas por microscopia óptica.

3.4.2. Recolección de las muestras fecales:

Se recolectó muestras fecales de pacientes que acudieron al consultorio Externo del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM. Dichas muestras se transportaron en frascos especiales con tapa rosca y sin fijador y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de la sección de parasitología donde se refrigeraron a 4°C. (Anexo N°1)

3.4.3. Examen parasitológico de las muestras fecales

Todas las muestras recolectadas se analizaron mediante examen microscópico en fresco, el mismo consistió en el montaje de una gota de muestra sobre una lámina portaobjetos juntamente con una gota de solución de lugol y luego cubiertas con una laminilla. Así mismo, las muestras fecales fueron concentradas por centrifugación con el objetivo de incrementar la sensibilidad del diagnóstico parasitológico. (Anexo N°2)

3.4.4. Extracción del ADN genómico de las muestras fecales

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el método de guanidina-fenol con calentamiento y descongelamiento. El ADN extraído y purificado se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso. (Anexo N°3)

3.4.5. Primers para la prueba de PCR

Se evaluaron un total de 3 primers nuevos de 2 genes distintos que fueron diseñados por medio de los programas BLAST, Primer3 y OligoDesign. Los primers para el gen de la beta-giardina fueron:

Beta-giardina-1F: AGATGATCAAGGACGCCATC

Beta-giardina-1R: GTGCTTTGTGACCATCGAGA

y para la proteína de choque térmico 70:

GHSP70 1F: CCTGACAGACGCTGATTTGA y

GHSP70-1R: TCGCTGATTGTCCTCTGATG

GHSP70-2F: ACGGGTTTCTTGGAGGAGAT

GHSP70-2R: TCGCTGATTGTCCTCTGATG

3.4.6. PCR convencional

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700, (Applied Biosystems, CA) con un volumen final de la mezcla de reacción de 25 µL en microtubos de PCR de 0.2 mL. Las condiciones de reacción se optimizaron mediante la combinación de un *primer forward* y un *primer reverse* específico para segmentos del genoma de *Giardia*. 1.5 µL de la muestra de ADN genómico se mezcló con 23.5 µL de la mezcla de reacción que contuvo una concentración final de los siguientes reactivos: 0.3 mM de cada uno de los dNTPs (10 mM, dNTPmix each 1 mL, Fermentas), 0.6 µM de cada uno de los *primers forward* y *reverse*, 1.5 mM MgCl₂ (15 mM, 1.25 mL, Thermo scientific), 0.75 U/Rxn de la enzima *Taq* polimerasa (*Taq* DNA polimerase recombinante 5U/µL, 500U. Thermo scientific) en *Taq* buffer 1X (with KCl 1.25 mL). Las condiciones de la PCR fueron: Una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de denaturación (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto); y una extensión final de 72°C por 7 minutos para permitir que todos los segmentos específicos de ADN terminen de amplificarse. Al término de la reacción, los productos se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento se aplicó para los *primer forward* (beta-giardina 1F) y un *primer reverse* (beta-giardina 1R); *primer forward* (GHSP-70 1F) y un *primer reverse* (GHSP-70 1R) y para *primer forward* (GHSP-70 2F) y un *primer reverse* (GHSP-70 2R). Anexo N° 4

3.4.7. Electroforesis de los productos de amplificación de la prueba de PCR

Aproximadamente 6 µL de los productos de la reacción de la prueba de PCR se sometieron a electroforesis en una cámara electroforética horizontal (Clever scientific Ltd) haciendo uso de un gel de agarosa al 2 %. Se aplicó un voltaje de 75 V por 110 minutos. Al término de la corrida electroforética cada gel fue teñido con bromuro de etidio y se expuso a rayos UV para la visualización final de los productos de amplificación de la PCR. Para el cálculo de los pesos moleculares de los productos de amplificación, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp. (Anexo N°5)

3.4.8. Análisis de las reacciones cruzadas de las pruebas de PCR convencional

Para evaluar la especificidad de la prueba de PCR se analizó un grupo de muestras fecales de individuos con algún tipo de infección parasitaria diferente de *G. intestinalis*.

3.5. Análisis de los resultados

Las muestras evaluadas se dividieron en dos grupos: positivas a *G. intestinalis* y negativas a *G. intestinalis*, las cuales se evaluaron por microscopia óptica que es la prueba de referencia y por la prueba molecular para cada primers. Se obtuvo la sensibilidad y especificidad de cada primers.

IV. RESULTADOS

La estandarización de los primers que amplifican regiones de *G. intestinalis* se realizó usando como control positivo una muestra de heces positiva solo a *G. intestinalis* y una muestra de heces negativa al mismo parásito, las cuales se determinaron primero por método directo y posteriormente se realizó la concentración de la muestra. La mezcla de reacción ideal para los tres primers usó 1.5 µL de la muestra de ADN genómico mezclado con 23.5 µL de los demás reactivos, obteniéndose una concentración final de: 0.3 mM de dNTPs mix, 0.6 µM de cada uno de los *primers forward* y *reverse*, 1.5 mM MgCl₂, 0.75 U/Rxn de la enzima *Taq* polymerase en tampón *Taq* 1X. Se logró obtener una misma mezcla de reacción para los tres primers. Además, las condiciones de termociclado para los 3 primers incluyeron una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de denaturación (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minutos); y una extensión final de 72°C por 7 minutos. Luego de la amplificación los productos de la reacción fueron identificados mediante una corrida electroforética usando las siguientes condiciones: gel de agarosa al 2%, 6 µL de muestra con 1µL de loading 6x y 3 µL del marcador de peso molecular sometidos a 75 voltios por 110 minutos, habiéndose realizado la electroforesis para los tres primers en las mismas condiciones, lo que permitió realizar la amplificación en un solo paso para los 3 primers. (Figura N°1).

La determinación del límite de detección se hizo con una muestra positiva a *G. intestinalis* evaluada por microscopia óptica y que tenía una concentración de 31 444 quistes/µL determinados en una cámara de Neubauer. La muestra fue diluida en agua desionizada hasta obtener una dilución de 1/2048. Todas las muestras de heces fueron extraídas por un método químico, que consistió en el uso de un tampón de lisis, GPT (Guanidina tiocianato, tris y fenol) con calentamiento y descongelamiento para poder

lisar la pared quística de la *G. intestinalis*, obteniéndose concentraciones altas de ADN entre un rango de 24.1 ng/μL a 2156.2 ng/μL. La extracción resultante fue productiva con lecturas de densidad óptica en el rango de 1.79 a 2.04, rango que incluye la variación de densidad óptica 1.8 a 2.0, posteriormente a la extracción se amplificó el ADN parasitario usando los 3 primers con la finalidad de determinar el límite de detección correspondiente a cada una de las muestras previamente diluidas. Se identificó para la beta-giardina un título de 1024 con una concentración de 87.3 ng/μL aunque no se identificó banda en las diluciones anteriores, mientras que para GHSP70-1 se observó bandas desde el título 16 hasta 2048 con una concentración de 359.5 ng/μL y para la GHSP70-2 solo se observó banda en el título 2048 con una concentración de 24.1 ng/μL, demostrando variaciones en el límite de detección de los primers a pesar de haber sido trabajado con las mismas condiciones y con las mismas muestras diluidas. (Figura N°2, Tabla I)

Siendo parte de la estandarización, se validó los 3 primers mediante la recolección de 30 muestras fecales pertenecientes a distintas personas, entre las cuales se obtuvieron 15 muestras positivas a *G. intestinalis*, de las cuales 3 muestras tuvieron infecciones mixtas, 2 muestras revelaron trofozoítos y quistes de *G. intestinalis* y 10 muestras fueron solo positivas a quistes de *G. intestinalis*. De las 15 muestras negativas a *G. intestinalis*, 5 muestras no revelaron ningún parásito, 5 muestras presentaron infección mixta y 5 muestras revelaron un solo parásito.

Las muestras fecales recolectadas fueron extraídas por métodos químicos guanidina-fenol, posteriormente fueron cuantificadas para la determinación de su concentración de ADN a una densidad óptica de 260/280, obteniendo una concentración entre un rango de 2.6 ng/μL y 2160.3 ng/μL, además 3 muestras presentaron una concentración de

ADN de 1224.8 ng/ μ L, 1771.3 ng/ μ L y 2160.3 ng/ μ L; y se obtuvo una densidad óptica entre un rango de 2.04 y 1.16, se encontró solo 9 muestras por encima de 1.8 y 21.

Las muestras extraídas se amplificaron por PCR para cada primer y evidenciadas por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para los primers evaluados. Las muestras fecales amplificadas para la beta-giardina revelaron 2/15 (13.3% de positividad), mientras que para el primer GHSP70-1 se obtuvo positividad en 4 muestras positivas de las 15 evaluadas (36.36% de positividad) y los primers de la GHSP70-2 presentaron positividad en 2 de 15 muestras (13.3% de positividad). (Figura N°3, Tabla II)

TABLA I.

Numero de quistes de *G. intestinalis*, concentración de ADN y densidad óptica.

QUISTE <i>G. intestinalis</i> DILUIDAS	CONCENTRACION DE ADN ng/μL	DENSIDAD ÓPTICA 260/280
1	2156.2	1.79
½	954	2.04
¼	654	1.82
1/8	471	2.02
1/16	359.5	1.91
1/32	305.3	1.89
1/64	265.5	1.80
1/128	195.5	1.98
1/256	121.1	2.00
1/512	115.6	2.00
1/1024	87.3	1.75
1/2048	24.1	1.93

TABLA II.

Concentración de ADN, tipo de parásito y densidad óptica de las muestras analizadas con los primers en evaluación.

CODIGO	DESCRIPCION	CONCENTRACION DE ADN ng/μL	COCIENTE DE ABSORBANCIA 260/280
133	<i>E. coli</i>	2.6	1.61
134	<i>B. hominis</i>	2783	1.61
109	<i>E. coli, H. nana</i>	1224.8	2.04
185	<i>Ch. mesnili</i>	2.5	2
186	<i>E. coli, I. butschlii</i>	521.6	1.7
139	Negativo	86.8	1.63
141	Negativo	1771.3	2
127	<i>Ch. mesnili,</i> <i>B. hominis</i>	2160.3	1.83
182	Negativo	11.2	1.71
Bh	<i>B. hominis</i>	6.5	1.92
91	Negativo	333.3	1.68
92	Negativo	31.4	1.64
93	Negativo	50	1.32
167	<i>B. hominis.</i>	74.7	1.31
	<i>E. hystolitica/ E.</i> <i>dispar, E. nana</i>		
160	<i>B. hominis, E. nana,</i> <i>E. hystolitca/ E.</i> <i>dispar</i>	32.9	1.58
173	Quiste <i>G.</i> <i>intestinalis, E. coli</i>	191.1	1.16
175	Quiste <i>G. intestinalis</i>	3	1.87
145	Quiste <i>G. intestinalis</i>	47.3	1.61
146	Quiste <i>G. intestinalis</i>	124.1	1.54
154	Quiste <i>G. intestinalis</i>	145.7	1.27
179	Quiste <i>G. intestinalis</i>	47.2	1.69
157	Quiste <i>G. intestinalis</i>	33.9	1.31
	<i>B. hominis</i>		
P3	Quiste <i>G. intestinalis</i>	17.1	1.44
J3	Quiste <i>G. intestinalis</i>	66.4	1.79
123	Quiste <i>G. intestialis</i>	8.1	1.93
117	Quiste y trofozoítos <i>G. intestinalis</i>	12.6	1.85
181	Quiste <i>G. intestinalis</i>	9.3	1.93
	<i>H. nana</i>		
118	Quiste y trofozoítos <i>G. intestinalis</i>	11.9	1.74
112	Quiste <i>G. intestinalis</i>	269.9	1.66
104	Quiste <i>G. intestinalis</i>	6.5	2.01

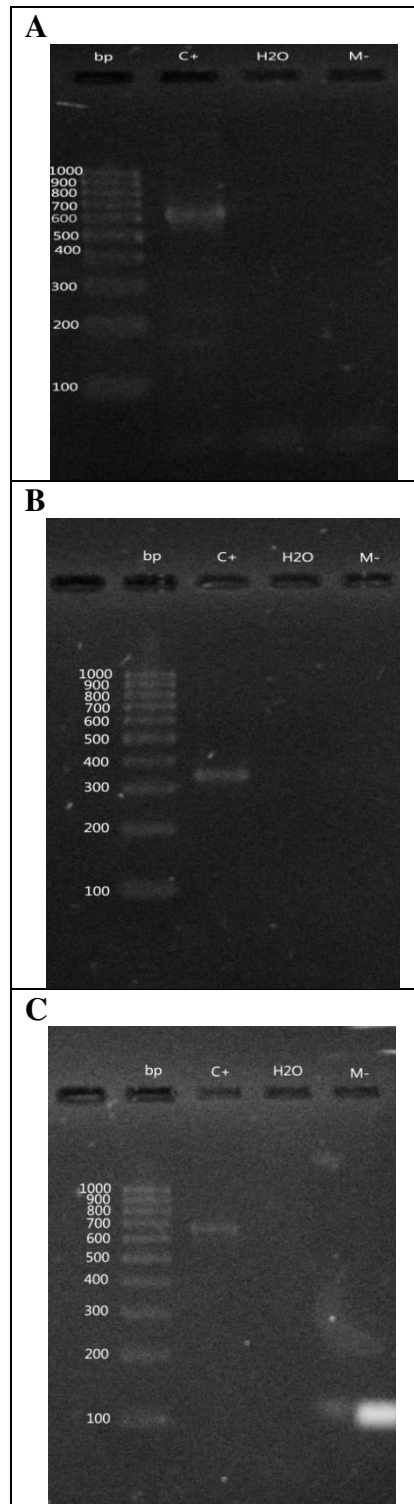


Figura 1. Estandarización de la PCR convencional para la detección de *G. intestinalis* con 3 muestras distintas: Muestra de quistes *G. intestinalis* (C+), muestra de H₂O (H2O) y muestra negativa (M-). Electroforesis en gel de agarosa al 2% y revelado con bromuro de etidio. (A) Producto amplificado (635 bp) obtenido de cebadores de la beta-giardina 1F y beta-giardina 1F, (B) Producto amplificado (334 bp) obtenido cebadores de la GHSP70 1F y GHSP70 1R. (C) Producto amplificado (662 bp) obtenido cebadores de la GHSP70 2F y GHSP70 2R.

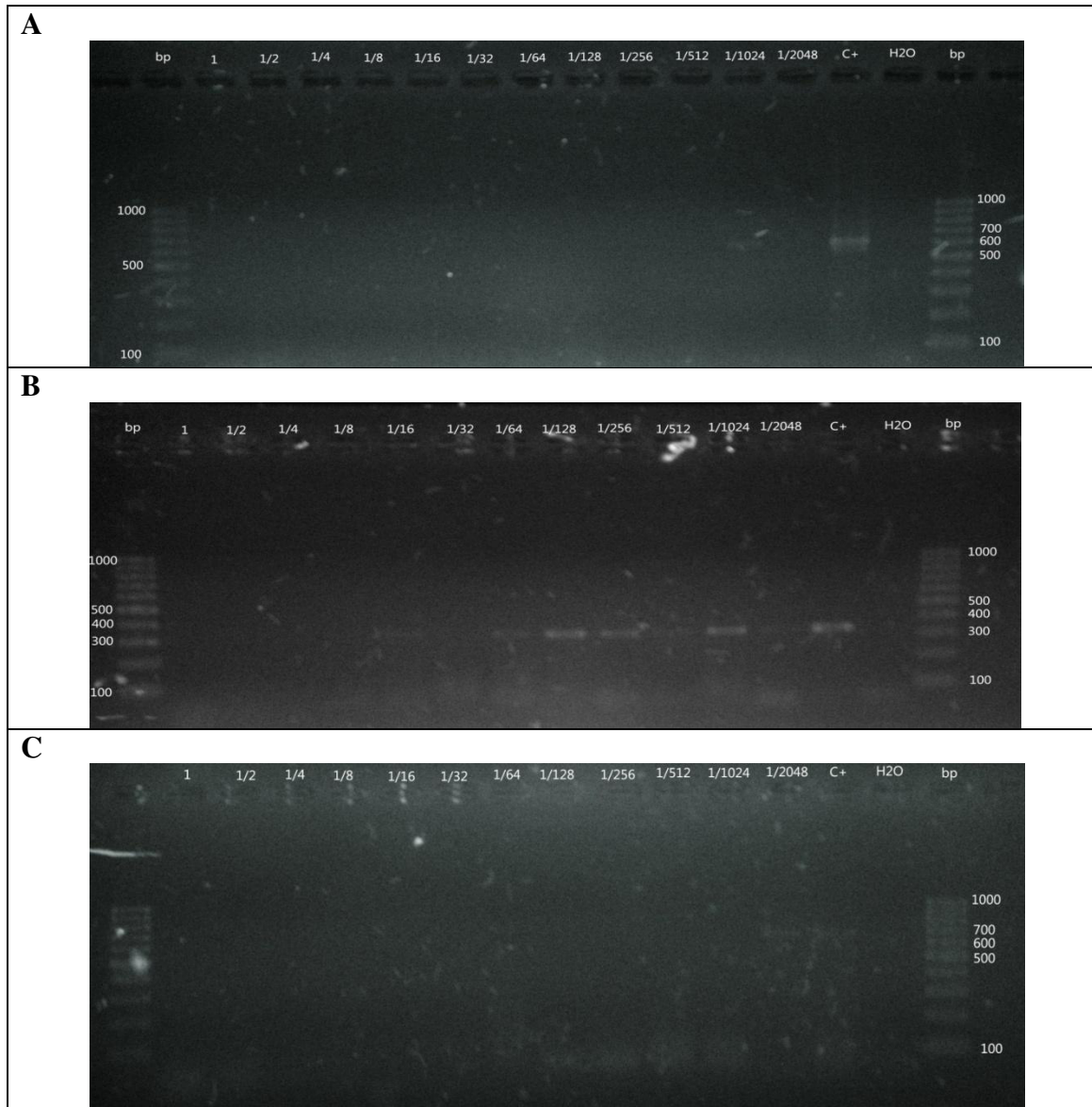


Figura 2. Determinación del límite de detección de los primers beta giardina, GHSP70-1 y GHSP70-2 en geles de agarosa al 2%, revelado mediante el uso del bromuro de etidio. Se utilizaron las siguientes muestras: 1: *G. intestinalis*, 2: *G. intestinalis* diluida 1/2, 4: *G. intestinalis* diluida 1/4, 8: *G. intestinalis* diluida 1/8, 16: *G. intestinalis* diluida 1/16, 32: *G. intestinalis* diluida 1/32, 64: *G. intestinalis* diluida 1/64, 128: *G. intestinalis* diluida 1/128, 256: *G. intestinalis* diluida 1/256, 512: *G. intestinalis* diluida 1/512, 1024: *G. intestinalis* diluida 1/1024, 2048: *G. intestinalis* diluida 1/2048, C+: control positivo, H2O: agua PCR.

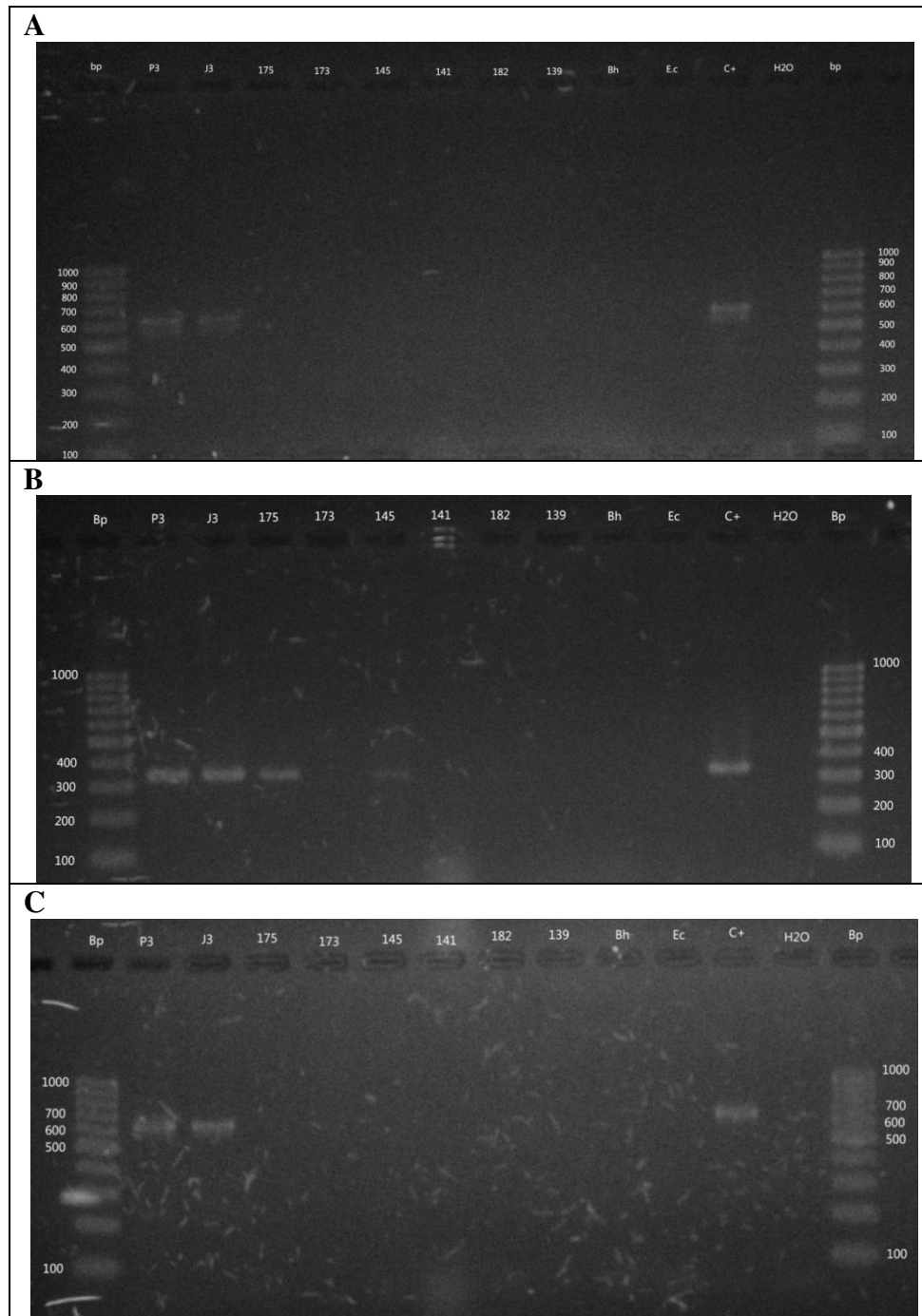


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de muestras de fecales las cuales son: quistes de *G. intestinalis* (P3, J3, 175 y 145), quistes *G. intestinalis* y quiste *E. coli* (173), Negativas (141, 182 y 139), Bh: *B. hominis*, Ec: quiste *E. coli*, C+: Control positivo y H2O: Agua. (A) Electroforesis con los primers de la beta-giardina 1F y beta-giardina 1R. (B) Electroforesis con los primers de la GHSP70 1F y GHSP70 1R. (C) Electroforesis con los primers de la GHSP70 2F y GHSP70 2R.

V. DISCUSIÓN

G. intestinalis es uno de los parásitos patógenos de mayor prevalencia en todo el mundo y el examen microscópico es aun el principal método de diagnóstico para su determinación en el laboratorio.

Se estandarizó un protocolo de extracción que permitió obtener el ADN de las muestras fecales y eliminar los posibles inhibidores, se usó un método químico que consistió en un tampón de lisis de hidróxido de sodio, 2-mercaptoetanol, EDTA y Triton X-100. Este tampón de lisis fue descrito por Molina y col quienes reportaron (35) que el Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, Mercaptoetanol 1mM, proteinasa K 1 mg/mL lograron una mejor extracción de ADN en trofozoítos de *G. intestinalis* en comparación con el uso de sistemas de extracción por columna de silica para muestras fecales (35). El uso de proteinasa K para la extracción del ADN en quistes de *G. intestinalis* descrito por dichos autores, es muy costoso, por lo tanto el protocolo desarrollado en el presente estudio es una alternativa interesante para la extracción sin necesidad del uso de proteinasa K. La extracción hecha resultó adecuada para ser usada en muestras fecales con quistes de *G. intestinalis*, puesto que dicho parásito presenta una pared quística difícil de romper, entonces se añadió al procedimiento de extracción una fase de calentamiento a 100°C y una fase de enfriamiento a -20°C para debilitar la pared del parásito en estudio, este paso también es descrito por otros autores quienes usaron temperaturas de 60°C o 100°C (24, 25, 36).

También se estableció una misma mezcla de reacción para los tres primers evaluados con igual temperatura de hibridación, esto se logró ya que los primers tienen una temperatura de melting entre 61.5-62.9°C e igual número de %GC por ende la temperatura de hibridación fue de 60°C. Además los primers presentaron igual número de ciclos, lo que permitió disminuir el tiempo en la realización de la PCR, esto ayudaría

a desarrollar una PCR multiplex para caracterizar genotípicamente a la *G. intestinalis*. Distintos estudios demuestran que para la estandarización de un primer se debe realizar con diferentes concentraciones de cloruro de magnesio, a distintas concentraciones de la muestra de ADN y distintas condiciones de temperatura de hibridación obteniendo diferentes resultados cuando se requiere utilizar distintos tipos de primers (25, 26).

El límite de detección para los primers evaluados mostró que a mayor concentración de quistes de *G. intestinalis* no se observó banda, como es el caso de los primers de la beta-giardina con una dilución de 1/1024 y la GHSP70-2 con una dilución de 1/2048. Estos solo mostraron bandas a partir de una concentración de 87.3 ng/μL y 24.1 ng/μL respectivamente, con excepción del GHSP70-1 que mostró banda desde la dilución 1/16 en adelante con una concentración de 359.5 ng/μL. Los primers GHSP70-2 y Beta-giardina detectaron menor cantidad de quistes en la muestra esto tiene relación con los estudios realizados por Rochelle Paul y col. (25) quienes mostraron que la PCR puede identificar entre 1 a 10 quistes para los genes de beta-giardina, ARNr 18s y HSP70. Estudios realizados por Nikaeen M. determinaron que la proteína de choque térmico detectó hasta 5 quistes en las muestras evaluadas, (25, 26) pero el primer de la GHSP70-2 detectó una mayor concentración de quistes en la muestra por lo que no se relaciona con los estudios realizados.

El presente estudio evaluó el límite de detección en base a la dilución de una muestra positiva a *G. intestinalis* pero en diferentes estudios se realizaron por medio de la determinación de números de quistes que van de un rango de 1 a 10 quistes. Sin embargo en la evaluación del límite de detección la dilución 1/2048 presenta 4605 quistes de *G. intestinalis*, siendo esta la mayor dilución en el presente estudio, por ende sería necesario realizar mayores diluciones para llegar a obtener valores de 1 a 10

quistes por muestra o realizar técnicas de micromanipulación para la obtención de quistes único, lo que permitiría una mejor correlación con otros estudios descritos.

El uso de dos primers distintos para la amplificación de un mismo gen de la proteína de choque térmico 70, los cuales fueron estandarizados bajo las mismas condiciones, arrojaron diferentes límites de detección para los primers (GHSP70-1 y GHSP70-2), teniendo un mejor resultado con el primer GHSP70-1 ya que detectó mayor cantidad de quistes y a una mayor concentración de ADN, debiéndose a una mejor especificidad del primers ya que la proteína de choque térmico 70 es un gen unicopia.

Las muestras de heces pueden presentarse con poca concentración de quistes y/o con un patrón de excreción quística de tipo intermitente, haciendo que la revisión de una única muestra de heces por microscopia óptica alcance una sensibilidad de entre 35 a 40%, la que se podría incrementar si se realiza un método de concentración de heces además de analizarse muestras seriadas. (5) En este sentido la PCR es importante en la detección de *G. intestinalis* por su alta sensibilidad y especificidad aunque esto dependa de las características de los primers. En este experimento, los primers para el gen de la proteína de choque térmico 70 presentaron una mayor sensibilidad en comparación con la beta-giardina, sin embargo los resultados también mostraron que al evaluar los 2 pares de primers para un mismo gen, el primer de la proteína de choque térmico 70, presentó diferentes sensibilidades siendo la GHSP70-1 un mejor primers que el de la GHSP70-2, debido a que detectó más muestras positivas (4 de 15 muestras positivas a microscopia óptica). Nuestros resultados pueden deberse al almacenaje de la muestra, condición ya reportada por algunos autores, quienes sugieren que el dicromato de potasio al 2.5% es el mejor método de almacenamiento de muestras fecales en comparación con los métodos de congelación, 4°C o formol (22). Además la gran cantidad de inhibidores presentes en la muestra podría reducir también la sensibilidad

debido a problemas en el proceso de extracción de las muestras. (34) También a las altas concentraciones de ADN que se obtuvo de la extracción de las muestras, ya que a concentraciones mayores de 100 ng/μL la PCR se puede ver inhibida.

Los primers de la beta-giardina y la proteína de choque térmico 70 fueron evaluados mediante un programa informático (BLAST) en el cual se buscó su especificidad a *G. intestinalis* donde se identificó que son específicos solo al ensamblaje A. *G. intestinalis* presenta 7 genotipos (A-G) siendo de infección a humanos los genotipos A y B por lo que la baja sensibilidad de los primers se deba a que no detectó los demás genotipos.

Al haber determinado que los 3 nuevos primers detectan específicamente a las regiones del gen de la beta-giardina y proteína de choque térmico 70 para *G. intestinalis*, y sobre todo de no producir reacciones cruzadas con otros patógenos, estos primers podrían ser utilizados para la caracterización y genotipificación de *G. intestinalis*, y permitirían su uso para obtener datos epidemiológicos más precisos.

En los últimos años se está utilizando el diagnóstico molecular tanto para la detección, caracterización y epidemiología de *G. intestinalis*, permitiéndose así reconocer diferentes especies y genotipos que podrían estar relacionado con la fuente de contagio del parásito que puede tener un origen humano o zoonótico. Por lo tanto, la tarea continúa de estandarización y evaluación de primers que pueden amplificar secuencias específicas del parásito, nos permitirá desarrollar nuevas pruebas de PCR para la detección molecular del parásito.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- Las condiciones de PCR para los primers fue a 60°C de temperatura de hibridación y 1.5 mM concentración de cloruro de magnesio que permitieron la detección de *G. intestinalis*.
- El gen de la proteína de choque térmico 70 en comparación con la beta-giardina, presenta una mejor detección de quistes de *G. intestinalis*, ya que detecta mayor número de muestras positivas.
- Los primers de la proteína de choque térmico 70 y la GHSP70-1 presentaron una mejor sensibilidad y mejor límite de detección en comparación con los primers de la GHSP70-2.

6.2 RECOMENDACIONES

- No se recomienda almacenar las muestras de heces por largos periodos de tiempo, debiéndose realizar el análisis de PCR de inmediato. Esto permitiría evitar el deterioro del material genómico de *G. intestinalis* y evitar falsos negativos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Sulaiman I, Fayer R, Bern C, Gilman R, Trout J, Schantz P, Das P, Lal A, Xiao L. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis* Emerging Infectious Diseases. 2003; 9 (11):1444-1452.
2. Stensvold C, Lebbad M, Verweij J. The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. Trends in Parasitology. 2011; 27(2):53-58.
3. Boontanom P, Siripattanapipong S, Mungthin M, Tan-ariyal P, Leelayoova S. Improved Sensitivity of PCR Amplification of Glutamate Dehydrogenase Gene for Detection And Genotyping of *Giardia duodenalis* In Stool Specimen. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2010; 41(2):280-284.
4. Guy R, Xiao Ch, Horgen P. Real-Time PCR Assay for Detection and Genotype Differentiation of *Giardia lamblia* in Stool Specimens. American Society for Microbiology. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(2):3317–3320.
5. Alcaraz M. Giardia y Giardiosis. Control calidad SEIMC. Valencia
6. World Health Organization, UNICEF. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, 1-44. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland; 2009.
7. Bodhidatta L, McDaniel P, Sornsakrin S, Srijan A, Serichantalergs O, Mason CJ. Case-control study of diarrheal disease etiology in a remote rural area in Western Thailand. Bangkok, Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2010, 83(5):1106-1109.

8. Veenemans J, Mank T, Ottenhof M, Baidjoe A, Mbugi E, Demir A, Wielders J, Savelkoul H, Verhoef H. Protection against Diarrhea Associated with *Giardia intestinalis* Is Lost with Multi-Nutrient Supplementation: A Study in Tanzanian Children. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5(6):1-10.
9. Huruy K., Kassu A., Mulu A., Worku N., Fetene T., Gebretsadik S., Biadglegne F., Belyhun Y., Muche A., Gelaw A., Anagaw B., Yifru S., Wondie Y., Bekele A., Tiruneh M., Reissig D., Moges F. Intestinal parasitosis and shigellosis among diarrheal patients in Gondar teaching hospital, northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*. 2011; 4(472):1-8.
10. Eppig C, Fincher C, Thornhill R. Parasite prevalence and the worldwide distribution of cognitive ability. *The Royal Society*. 2010. Páginas 1-8.
11. Hunter PR., Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal Parasitology*. 2005; 35:1181–1190.
12. Okhuysen, P. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clinical infectious diseases*. 2012; 33:110-114.
13. Mellingen KM, Midtun A, Hanevik K, Eide GE, Søbstad Ø, Langeland N. Post epidemic giardiasis and gastrointestinal symptoms among preschool children in Bergen, Norway. A cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2010; 10(163).
14. Adam R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(3):447-475.
15. Slifko T.R., Smith H.V., Rose J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30:1379–1393.

16. Vázquez T.O., Campos R.T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Revista del Centro de Investigación. 2009. 8(31):75-90.
17. Atias A. Parasitología Humana. 1ra Edición. Santiago: Chile; 1998
18. Winn (h.) WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman Diagnostico microbiológico texto y atlas a color. 6ta Edición. Madrid: España; 2006.
19. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humana. Incluye animales venenosos y ponzoñosos, y atlas en color al final. 4ta Edición. Medellín: Colombia; 2005.
20. Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: Overview and update. Clinical Infectious Diseases. 1997. 25:545–549.
21. Miller K, Sterling C. Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of *Giardia lamblia* Cysts. Applied and environmental microbiology. 2007; 73(18):5949-5950.
22. Fuentes I, Gutierrez M, Garate T. Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 2010; 28:33-39
23. Asher AJ, Waldron LS, Power ML. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. Parasitology Research. 2012; 110:853–858.
24. Mahbubani M, Bej A, Perlin M, Schaefer F, Jakubowski W, Atlas R. Differentiation of *Giardia duodenalis* from Other *Giardia* spp. By Using Polymerase Chain Reaction and Gene Probes. Journal of clinical microbiology. 1992. Volumen 30(1):74-78.

25. Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH y Wolfe RL. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water. *Applied and environmental microbiology*. 1996; 63(1):106–114.
26. Nikaeen M, Mesdaghinia AR, Tehrani M, Rezaian M, Vaezi F. Sensitive Detection of *Giardia* Cysts by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Iranian Journal Public Health*. 2003; 32(1):15-18.
27. Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi, L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, Caccio M. A Novel *Giardia duodenalis* Assemblage A Subtype in Fallow Deer. *The Journal of Parasitology*. 2007; 93(2):428-432.
28. Thompson RCA, Hopkins RA, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*. 2000; 16(5):210–213.
29. Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, DiCesare JL, Haff J, Atlas RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. 1990. *Molecular and Cellular probes*. 4(5):353-365.
30. Bej, AK, Steffan RJ, DiCesare J, Haff L, Atlas RM. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. 1990. *Applied and environmental microbiology*. 56(2):307-314.
31. Gupta RS, Aitken K, Falah M, Singh B. Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: Implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 91:2895-2899.

32. Kuk S, Suleyman Y, Cetinkaya U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012; 107:965-968.
33. Abbaszadegan M, Huber M, Gerba Ch, Pepper I. Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts. *Applied and environmental microbiology*. 1997; 63(1):324–328.
34. Besetti J. An introduction to PCR inhibitors. 2007. Páginas 9-10. Consultado 15 setiembre 2013. Disponible en: <http://www.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1001/an%20introduction%20to%20pcr%20inhibitors.pdf>.
35. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Apestegui M, Aguilar M, Basulado J. Comparacion de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitologia Latinoamericana*. 2006. 61:133-137.
36. Mahbubani M, Bej A, Perlin M, Schaefer F, Jakubowski W, Atlas R. Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts. *Applied And Environmental Microbiology*. 1991. 57(12):3456-3461.

VIII. ANEXO

Anexo 1.

PROTOCOLO DE RECOLECCION DE MUESTRA DE HECES.

Materiales

- Frasco con muestras fecales.
- Refrigeradora

Procedimiento

1. Se recolectaron del consultorio externo del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrion”, UNMSM solo las muestras de heces que no tuvieran preservantes.
2. Se recolectaran todas las muestras de heces que fueron posibles.
3. Las muestras fecales recolectadas se almacenaron a 4°C, como máximo 3 días.

Anexo 2:

PROTOCOLO DEL EXAMEN PARASITOLOGICO

Materiales

- Microscopio óptico
- Muestras fecales almacenadas a 4°C
- Lugol
- Láminas
- Laminillas
- Congeladora
- Copas de plástico
- Gasas
- Tubos de plástico de 10 mL
- Congeladora
- Palitos de chupete

Procedimiento

1. Se colocó una gota de lugol en la lámina portaobjetos, sobre la cual se depositó con un palito de chupete un poco de muestra fecal almacenada a 4°C, la cual se mezcló y fue cubierta con una laminilla.
2. Las láminas con muestras fecales fueron analizadas por microscopia óptica primero a 4x, luego a 20x y por último a 40x lo que permitió la identificación del parásito.
3. Las muestras positivas para el parásito fueron evaluadas por sedimentación en copa.

4. Lo recolectado en la copa fue colocado en tubos de plástico de 10 mL y centrifugado a 3000 rpm durante 6 minutos.
5. El sedimento de la muestra fue evaluado por microscopia óptica. Cada tubo fue rotulando de la siguiente manera: parásito presente, parásitos por campo y la fecha de recolección.
6. Todos los tubos recolectados fueron almacenados a -20°C.

Anexo 3.

EXTRACCIÓN DE ADN

Materiales

- Microtubos de polipropileno de 1.5 mL y 2 mL
- Buffer de lisis N° 3 (Tris-HCl 1M, pH 8.0, EDTA 0.5M, pH 8.0, NaOH, SDS, Triton X-100, 2-Mercaptoetanol)
- Buffer GPT (5M Guanidine thiocyanate, Tris 0.05M – pH 8.0 y fenol al 50%)
- Cloroformo
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
- Isopropanol puro
- Etanol al 70 %
- Agua PCR
- Microcentrifuga, vortex, baño maría a 100°C y congeladora de -20°C
- Micropipetas de 20 -200 µL, 100-1000 µL
- Puntillas blancas y azules estériles y con filtro
- Vortex

Procedimiento

1. Mezclar 300 µL de la muestra con 300 µL de buffer de lisis N° 3 en un microtubo estéril de 2 mL y mezclar con vortex por 1 min.
2. Adicionar 600 µL de reactivo GPT e incubar a 100°C por 30 min. Congelar a -20°C por 1 h. Colocar a 100°C por 5 min y dejar enfriar a 4 °C por 5 min.
3. Centrifugar la mezcla a 13,000 rpm por 10 min. Transferir el sobrenadante (aproximadamente 700 a 800 µL) a un microtubo nuevo

4. Adicionar 500 μ L de cloroformo, mezclar con vortex por 1 min y centrifugar a 13 000 rpm por 10 min. Colectar la fase acuosa con cuidado (parte superior) y transferirla a un microtubo nuevo de 1.5 mL.
5. Mezclar la fase acuosa v/v con la solución Fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1) por 1 min y centrifugar a 13 000 rpm por 10 min. Repetir 2 veces más o hasta que no se observe precipitado oscuro en la interfase.
6. Colectar con cuidado el sobrenadante (aproximadamente 400 – 500 μ L) y transferirlo a un microtubo de 1.5 mL y luego agregar un volumen igual de isopropanol puro, mezclar con vortex e incubar a -20°C por 1 h o toda la noche.
7. Centrifugar el microtubo a 13 000 rpm por 5 min, descartar todo el sobrenadante sin tocar el sedimento de ADN.
8. Adicionar 600 μ L de agua grado PCR y 600 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, agitar fuertemente para que se mezclen los reactivos o mezclar con vortex por 1 min, centrifugar a 13 000 rpm por 10 min. Colectar la fase acuosa con cuidado (parte superior) y transferirla a un microtubo nuevo de 1.5 μ L.
9. Colectar con cuidado el sobrenadante (aprox. 400 – 500 μ L), transferirlo a un microtubo y luego agregar un volumen igual de isopropanol puro, mezclar con vortex e incubar a -20°C por 1 h o toda la noche.
10. Centrifugar el microtubo a 13 000 rpm por 5 min, descartar todo el sobrenadante sin tocar el sedimento de ADN.
11. Lavar el sedimento con 500 μ l de etanol al 70%, mezclar por inversión (10 veces) y luego centrifugar a 13 000 rpm por 5 min. Descartar todo el sobrenadante con ayuda de papel toalla.
12. Resuspender el sedimento (ADN) con 50 μ L de agua grado PCR o buffer TE y guardar a -20°C hasta el momento de su uso.

Anexo 4.

PROTOCOLO DE PCR

Responsable: _____ Fecha de ensayo: _____

Ensayo: _____

	CODIGO	Resultado	REACTIVOS	MARCA	[INICIAL]	[FINAL]	Vol x 1 (μ L)	Vol x
1			H2O PCR				12.8	
2			BUFFER 10X		10X		5	
3			Cl2Mg		50mM	1.5 mM	1.5	
4			Primer Forward		20 μ M	0.32 μ M	0.4	
5			Primer Reverse		20 μ M	0.32 μ M	0.4	
6			dNTPs Mix		10 mM	0.3 mM	2	
7			Taq Polimerasa		5 U/ μ L	4 U/Rx	0.4	
8			DNA				2.5	
9			Vol.Total				25.00 μL	
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

	T °C	TIEMPO
DENATURACIÓN INICIAL	94°C	3 min
35 CICLOS	DENATURACIÓN	94°C
	HIBRIDIZACIÓN	60°C
	EXTENSIÓN	72°C
EXTENSIÓN FINAL	72°C	10 min

Electroforesis Gel:

Anexo 5.

PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS

Materiales

- Agarosa
- Buffer TAE 1X
- Cámara de electroforesis
- Puntillas de 20 μ L
- Micropipeta de 20 μ L
- Cubeta con bromuro de etidio
- Cubeta de lavado con agua de caño
- Matraz de Elmermeyer de 250 mL
- Horno microondas
- Balanza analítica

Procedimiento

1. Para preparar agarosa al 2%, pesar en una balanza analítica 1.5 gramos de agarosa, depositar en un matraz de Elmermeyer de 250 mL y añadir 100 mL de buffer TAE 1X.
2. Llevar el matraz al horno microondas por un tiempo de 3 min para disolver la agarosa.
3. Depositar la agarosa disuelta en la cámara y esperar hasta que se solidifique.
4. Llevar la cámara a la cubeta de electroforesis y realizar una precorrida de 75 voltios por 5 minutos.

5. Colocar 6 μL de muestra, previamente mezclada con tampón de corrida 6X (1 μL de tampón de corrida con 6 μL de muestra), luego agregar 3 μL de estándar de peso molecular en el último pocillo del gel de agarosa.
6. Realizar la electroforesis a 75 voltios por 110 minutos.
7. Luego colocar el gel en la cubeta de bromuro de etidio por 8 minutos
8. Luego en la cubeta de lavado, proceder a eliminar el bromuro de etidio del gel de agarosa, por un tiempo de 25-40 min
9. Por último proceder a tomar las fotos de la corrida.